

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 37 41 183 A1

⑯ Int. Cl. 4:

C07K 7/10

C 07 K 1/06

C 07 K 1/10

C 07 K 3/20

// C07K 17/08

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

04.12.86 IT 22560 /86

⑯ Anmelder:

Eniricerche S.p.A., Mailand/Milano, IT

⑯ Vertreter:

Zumstein, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Klingseisen, F.,  
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑯ Erfinder:

Bernardi, Adriano, Monterotondo, Rom/Roma, IT;  
Bonelli, Fabio; Pessi, Antonello, Rom/Roma, IT;  
Verdini, Antonio Silvio, Monterotondo, Rom/Roma,  
IT

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Immunologisch aktive Polypeptide, die für die Herstellung von Antimalaria-Vakzinen und diagnostischen Ausrüstungen für die Auffindung von Antisporozoit-Antikörpern nützlich sind

Immunologisch aktive Polypeptide, bestehend, gegen das N-endständige Ende, aus einer Asn-Val-Asp-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Sequenz, die dreimal wiederholt ist, und, gegen das C-endständige Ende, aus wenigstens drei Quadrupletts mit einer Asn-Ala-Asn-Pro-Sequenz, gebunden aneinander durch eine amidische Bindung zwischen dem Endprolin der ersten Sequenz und dem Anfangsasparagin des ersten Quadrupletts.

Diese Polypeptide reproduzieren annähernd genau die Sequenzstruktur des Circumsporozoit-Proteins von *P.falciparum* und sind für die Herstellung von Antimalaria-Vakzinen und diagnostischen Ausrüstungen zum Nachweis von Antisporozoit-Antikörpern in klinischen Proben von malariainfizierten Personen wertvoll.

DE 37 41 183 A1

DE 37 41 183 A1

## Patentansprüche

1. Immunologisch aktive Polypeptide, die zur Herstellung von Antimalaria-Vakzine und von diagnostischen Ausrüstungen für den Nachweis von Antisporozoit-Antikörpern nützlich sind, definierbar durch die folgende, allgemeine Formel (I)

(Asn-Val-Asp-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>3</sub>-(Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>n</sub>-Asn-Ala

(I)

worin

10 Ala = Alanin  
Asn = Asparagin  
Asp = Asparaginsäure  
Pro = Prolin  
15 Val = Valin

und worin  $n$  einen Wert gleich oder höher als 3 hat.

2. Polypeptide gemäß Anspruch 1, worin  $n$  einen Wert in dem Bereich von 3 bis 40 hat.

3. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) die erste Aminosäure (Ala), geschützt an der  $\alpha$ -Aminogruppe, auf einen unlöslichen, festen Träger durch Veresterungsreaktion zwischen der aktivierten Carboxygruppe und dem Verbindungshaken des festen Trägers kondensiert wird;

25 (b) die Schutzgruppe von der  $\alpha$ -Aminogruppe entfernt wird;

(c) die Ala-Aminosäure, gebunden an den unlöslichen, festen Träger, auf die zweite Aminosäure (Asn), die an ihrer  $\alpha$ -Aminogruppe durch eine Acylierungsreaktion zwischen der Schutzgruppen-abgespaltenen Aminogruppe und der aktivierten Carboxygruppe der zweiten Aminosäure geschützt wurde, kondensiert wird;

30 (d) die  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe von der zweiten Aminosäure entfernt wird;

(e) die nachfolgenden Aminosäuren kondensiert werden, wobei ihre Funktionalitäten in den Seitenketten geschützt sind, wenn dies notwendig ist, gemäß den Verfahrensweisen der obigen Schritte (c) und

35 (d), bis das Polypeptid (I) vollständig ist;

(f) das so erhaltene Polypeptid (I) von dem unlöslichen, festen Träger durch eine saure Hydrolyse freigesetzt wird;

35 (g) das Polypeptid (I) durch Chromatographie gewonnen und gereinigt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe Fluorenylmethyloxycarbonyl ist.

40 5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in der Stufe (a) die Veresterungsreaktion in einem inerten, organischen Lösungsmittel in Anwesenheit von Katalysatoren bei einer Temperatur in dem Bereich von  $-10$  bis  $40^{\circ}\text{C}$  durchgeführt wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das organische Lösungsmittel N,N-Dimethylformamid ist.

45 7. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Katalysatoren N-Methylmorpholin und 4-Dimethylaminopyridin sind.

8. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur Raumtemperatur ( $20$ – $25^{\circ}\text{C}$ ) ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in den Stufen (b) und (d) die Entfernung der  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe mit einem (20/80, Vol/Vol)-Piperidin/N,N-Dimethylformamid-Gemisch bei Raumtemperatur ( $20$ – $25^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in den Stufen (c) und (e) die Acylierungsreaktion in einem inerten, organischen Lösungsmittel in Anwesenheit von Katalysatoren bei einer Temperatur in dem Bereich von  $-10$  bis  $40^{\circ}\text{C}$  durchgeführt wird.

55 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das organische Lösungsmittel N,N-Dimethylformamid ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Katalysatoren 1-Hydroxybenzotriazol, 4-Dimethylaminopyridin und N-Methylmorpholin sind.

13. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperaturen in dem Bereich von 0 bis  $25^{\circ}\text{C}$  liegen.

60 14. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in der Stufe (f) die Entfernungsreaktion mit einer (90/10, Vol/Vol)-Trifluoressigsäure/Wasser-Lösung bei einer Temperatur in dem Bereich von 10 bis  $30^{\circ}\text{C}$  durchgeführt wird.

15. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in der Stufe (g) die Reinigung durch Chromatographie auf Molekularsieben und Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt wird.

65 16. Verwendung des Polypeptids gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur Herstellung von Antimalaria-Vakzinen.

17. Verwendung des Polypeptids gemäß den Ansprüchen 1 und 2 in Nachweismitteln zur Auffindung von

## Antisporozoit-Antikörpern in klinischen Proben, die von malariainfizierten Personen genommen wurden.

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft immunologisch aktive Polypeptide, die für die Herstellung von Antimalaria-Vakzinen und von diagnostischen Ausrüstungen für den Nachweis von Antisporozoit-Antikörpern in klinischen Proben von malariainfizierten Personen nützlich sind. 5

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung dieser Polypeptide.

Die Ursache der Malaria ist ein Protozoen-Parasit, der zum Genus Plasmodium gehört, mit einem Vitalzyklus, der zwischen einem wirbellosen Wirt, worin er eine sexuelle Form der Fortpflanzung zeigt, und einem Wirbeltier-Wirt, in dessen Inneren er sich durch einfache Schizogenie vermehrt, alterniert. 10

Unter den Hunderten von Species von Plasmodium, die in der Natur vorkommen, sind nur vier für den Menschen pathogen: P. ovale, P. vivax, P. malariae und P. falciparum.

Dieses letztere stellt insbesondere die Ursache der schwersten Form der Malaria dar, dem sog. "maligenen Tertianfieber" oder "Tertianmalaria". 15

Derzeit stellt die Malaria eine der schwersten parasitischen Erkrankungen für den Menschen dar.

Es wird geschätzt, daß diese Krankheit jedes Jahr 200 bis 400 Millionen der Bevölkerung befällt und eine Mortalitätsrate während der frühen Kindheit verursacht, die so hoch wie 50% der Fälle sein kann. 20

Aus Obigem wird die Notwendigkeit der Entwicklung einer wirksamen Antimalaria-Vakzine ersichtlich, d. h. einer Vakzine, welche in der Lage ist, die Erzeugung von Antikörpern zu stimulieren bzw. anzuregen, welche den Parasiten anzugreifen und zu neutralisieren vermögen und eine dauerhafte Schutzmündigkeit entwickeln. 25

Die Malariainfektion beim Menschen beginnt mit dem Stich der Anophelesmücke, welche innerhalb des Blutstroms eine gewisse Anzahl von Sporoziten freiläßt.

Innerhalb einer Stunde erreicht jeder Sporozoit eine hepatische Zelle, worin er die Bildung von 20 000 oder mehr Merozoiten hervorruft. 30

Dann dringt jeder Merozoit in ein Erythrozyt ein, worin es sich asexuell von Ringen in Schizonten vermehrt.

Der reife Schizont enthält individuelle Merozoiten, die noch nicht in der Lage sind, andere Erythrozyten zu durchdringen. Wenn der Erythrozyt platzt, setzt er 10 bis 20 reife Merozoiten frei, von denen einige sich in Gametozyten umwandeln, welche die die Mücke infizierende Form darstellen. 35

Die komplexe Struktur des Lebenszyklus der Malaria-parasiten hat es schwierig gemacht, bis jetzt eine Vakzine zu entwickeln, die mit den gewünschten Eigenschaften ausgestattet ist. 40

Diese Parasiten entwickeln tatsächlich gemäß einem Vielstufen-Zyklus, dem der Wirtsorganismus ausgesetzt ist, eine sehr große Anzahl von Antigenkomponenten, welche voneinander verschieden und stufen-spezifisch sind. 45

Nur eine kleine Fraktion dieser Antigenkomponenten induziert Immuno-Schutzreaktionen, während die anderen Fraktionen entweder für den Zweck eines Immunschutzes belanglos sind oder unerwünschte Reaktionen im Wirt anregen.

Die Schutzimpfung mittels Verwendung des ganzen Parasiten ist daher weder eine gültige noch praktikable Methode, da die Malaria-parasiten nicht in genügend großer Menge oder in einem zufriedenstellenden Reinheitsgrad erhalten werden können. 50

Daher sollte die Taktik zur Entwicklung einer Antimalaria-Vakzine auf der Identifizierung und Charakterisierung der einzigen parasitischen Antigene, welche spezifisch immuno-protective Reaktionen anregen, basieren.

Wenn einmal die Aminosäure-Sequenz des natürlichen Proteins identifiziert wurde, besteht der nächste Schritt in der Herstellung eines aktiven Moleküls und/oder aktiver Fragmente davon durch Methoden der chemischen Synthese oder der Gentechnik. 55

Während der vergangenen Jahre richteten die Forscher beim Versuch, Schutzplasmodien-Antigene zu identifizieren, ihr Interesse auf die extrazellularen Formen: Merozoiten, Sporoziten und Gametozyten, die einzigen Formen, welche dem Immunitätssystem ausgesetzt sind.

Insbesondere wurden viele Studien bezüglich der Identifizierung und Charakterisierung von an den Sporoziten gebundenen Antigenen durchgeführt. 60

Tatsächlich ist die Entwicklung einer Vakzine gegen diese Form des Parasiten besonders erwünscht, da, wenn sie beim Menschen wirksam ist, sie die nachfolgenden Schritte, welche für die Krankheit und für die Übertragung der Infektion verantwortlich sind, inhibieren bzw. verhindern kann.

Kürzlich wurde gezeigt, daß das hauptsächliche Membran-Antigen eines Sporoziten von P. falciparum ein Protein, genannt "circumsporotoitisch Protein" oder "CS", ist, das die gesamte Oberfläche des Sporoziten bedeckt. 65

Es ergibt sich, daß dieses Protein aus 412 Aminosäuren besteht mit einer zentralen Sphäre, die aus Tetrapeptiden besteht, mit einer Sequenz Asn-Ala-Asn-Pro, die 37 Mal wiederholt ist, und aus 4 Tetrapeptiden mit einer Sequenz Asn-Val-Asp-Pro (Dame et al, Science, 1984, 225, 593; Nussenzweig et al, Cell, 1985, 42, 401).

In der technischen und Patentliteratur wird von Verfahren zur Synthese von Proteinen berichtet, welche die sich wiederholenden Sequenzen Asn-Ala-Asn-Pro enthalten sowohl über rekombinante DNA als auch durch chemische Synthese. 70

Die Verfahren, welche die Techniken der Gentechnik verwenden, zeigen jedoch einige Nachteile, wie die Verwendung des pathogenen Mikroorganismus E. coli, und das Erzielen eines geschmolzenen Proteins, d. h. eines Proteins, das aus dem CS-Protein und einer heterologen Aminosäure-Sequenz besteht.

Ein Verfahren zur chemischen Synthese ist in der Europäischen Patentanmeldung 86105223.1, Veröffentlichungsnummer 209 643, vom 28. Januar 1987 geoffenbart, w. eine peptidische Sequenz beschrieben und beansprucht ist, die aus einem Gemisch von Peptiden besteht, worin die Sequenz (Asn-Ala-Asn-Pro) n-mal wiederholt

ist.

Aus Untersuchungen, die durchgeführt wurden, um die immunologischen Eigenschaften dieser Zusammensetzung zu bestimmen und ihre Fähigkeit der Herbeiführung einer Schutzmündigkeit zu bestimmen, wurde beobachtet, daß die peptidische Fraktion, die im Mittel 40 (Asn-Ala-Asn-Pro)-Quadruplets enthält, obzwar sie hoch immunogen ist, eine genetisch eingeschränkte Immunreaktion herbeiführt.

5 Tatsächlich werden durch eine solche Fraktion nur einige T-Cellularklone in Laboratoriumsmäusen angeregt.

Dies stellt einen Nachteil für die Entwicklung einer Antimaterie-Vakzine insofern dar, als sie nicht an allen Patienten wirksam ist.

10 Es wurde nun gefunden, daß es möglich ist, die Nachteile des Standes der Technik mittels immunologisch aktiver Polypeptide zu überwinden, welche in reiner Form durch ein einfaches und wirtschaftlich günstiges Verfahren erhalten werden können und die außer der Sequenz Asn-Ala-Asn-Pro noch andere peptidische Segmente, die in dem Protein des Parasiten vorhanden sind, umfassen.

15 Ein Ziel der vorliegenden Erfindung sind daher immunologisch aktive Polypeptide, die für die Herstellung von Antimalaria-Vakzine und von diagnostischen Ausrüstungen zum Nachweis von Antisporozoit-Antikörpern in klinischen Proben nützlich sind.

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist auch die Verwendung dieser Polypeptide zur Herstellung von Antimalaria-Vakzinen und diagnostischen Ausrüstungen zum Nachweis von Antisporozoit-Antikörpern in klinischen Proben.

20 Noch ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung dieser Polypeptide.

Noch weitere Ziele der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung und den Beispielen ersichtlich.

25 Insbesondere können die Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung durch die folgende allgemeine Formel (I) definiert werden:

(Asn-Val-Asp-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>3</sub>-(Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>n</sub>-Asn-Ala

(I)

25 worin

Asp = Asparaginsäure

Asn = Asparagin

30 Ala = Alanin

Pro = Prolin

Val = Valin

und worin n einen Wert gleich oder höher als 3 hat.

35 Die Polypeptide (I) nach bekannten, allgemeinen Techniken entweder in homogener Phase oder in fester Phase hergestellt werden.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird das Polypeptid (I) in fester Phase mittels eines Verfahrens synthetisiert, das umfaßt:

40 (a) die Kondensation der ersten Aminosäure (Ala), die an der  $\alpha$ -Aminogruppe auf einem unlöslichen, festen Träger mittels einer Veresterungsreaktion zwischen der aktivierten Carboxygruppe und dem Verbindungs-

haken des festen Trägers geschützt ist;

(b) die Entfernung der Schutzgruppe von der  $\alpha$ -Aminogruppe;

45 (c) die Kondensation der an den unlöslichen, festen Träger gebundenen Ala-Aminosäure auf die zweite Asp-Aminosäure, die an ihrer  $\alpha$ -Aminogruppe mittels einer Acylierungsreaktion zwischen der schutzgruppenentfernten Aminogruppe und der aktivierten Carboxygruppe der zweiten Aminosäure geschützt ist;

(d) die Entfernung der  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe von der zweiten Aminosäure;

(e) die Kondensation der nachfolgenden Aminosäuren nach den Grundsätzen, die oben für die Schritte (c) und (d) angegeben sind, bis das Polypeptid (I) vollständig ist;

50 (f) die Entfernung des so erhaltenen Polypeptids (I) von dem unlöslichen, festen Träger mittels saurer Hydrolyse;

(g) die Gewinnung und Reinigung des Polypeptids (I) durch Chromatographie.

55 Gemäß der vorliegenden Erfindung sind die unlöslichen, festen Träger ausgewählt aus Polyacrylamidharzen, Polystyrolharzen, die mit Divinylbenzol vernetzt sind, phenolischen Harzen.

Insbesondere wird ein handelsübliches Polyacrylamidharz verwendet, das mit Norleucin (NLe) als interner Referenz-Aminosäure funktionalisiert ist, und ein Haken für die Bildung der reversiblen Peptid-Harzbindung, wie z. B. p-Hydroxymethylphenoxyessigsäure.

60 Vor dem Kondensieren der Aminosäuren wird das funktionalisierte Harz durch eine Behandlung mit N,N-Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur oder bei Temperaturen nahe Raumtemperatur gequollen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung können die Aminosäuren zu dem Harz entweder individuell oder nach einer Vorsynthese in homogener Phase als vorgebildete Peptide zugegeben werden.

65 Die Aminosäuren werden auf das Harz nach einem vorherigen Schutz der  $\alpha$ -Aminogruppe und der möglichen reaktiven Funktionen in den Seitenketten und der Aktivierung der endständigen Carboxygruppe kondensiert.

Beispiele von  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppen, die für den vorgesehenen Zweck geeignet sind, umfassen: Benzylloxycarbonyl, Triphenylmethyl, tert-Amyloxycarbonyl, 2-Nitro-phenylsulfonyl, Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) und tert-Butyloxycarbonyl (Boc).

Von diesen sind die Fmoc- und Boc-Gruppen, die unter milden Arbeitsbedingungen entfernt werden können, bevorzugt. Die Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe ist besonders bevorzugt.

Mögliche reaktive, funktionelle Gruppen, die in den Seitenketten der Aminosäuren vorhanden sind, werden mit Schutzgruppen, die in der Fachwelt der Peptid-Synthesen bekannt sind, geschützt.

Typischerweise werden Schutzgruppen verwendet, welche unter den Bedingungen der Entfernung der  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe stabil sind.

Ein Beispiel für diese Schutzgruppen für Asparaginsäure ist tert-Butylester (OBu).

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Aktivierung der Aminosäure-Reste Val, Ala, Pro, Asp durch Reaktion mit Dicyclohexyl-carbodiimid (DCI) durchgeführt, um das symmetrische Anhydrid dieser Aminosäure an der endständigen Carboxygruppe zu bilden.

Im allgemeinen wird die Reaktion durchgeführt, indem die Aminosäure, wobei ihre  $\alpha$ -Aminogruppe geschützt ist, in einem inerten (nicht-reaktiven), organischen Lösungsmittel in Anwesenheit von Dicyclohexyl-carbodiimid bei Raumtemperatur (20–25°C) aufgelöst wird.

Am Ende der Reaktion wird Dicyclohexylharnstoff abfiltriert oder abzentrifugiert, das Lösungsmittel abgedampft und das so gebildete, symmetrische Anhydrid gewonnen.

Die Aktivierung des Asn-Aminosäure-Restes wird durch Reaktion mit einem Derivat des Phenols durchgeführt, um den aktiven Ester am Ende der Carboxygruppe zu bilden.

Phenolderivate, welche in dem erfundungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, sind fluorierte oder chlorierte Phenolderivate, wie z. B. Pentachlorphenol, Trichlorphenol, Pentafluorphenol und p-Nitrophenol.

Die Aktivierungsreaktion der Carboxygruppe der  $\alpha$ -Amino-geschützten Aminosäure wird durch Kontaktieren dieser Aminosäure und dieses Phenolderivats in einem inerten, organischen Lösungsmittel bei Raumtemperatur oder nahe Raumtemperatur durchgeführt.

Beispiele für organische Säuren, die für den vorgesehenen Zweck geeignet sind, werden ausgewählt aus den aprotischen Lösungsmitteln, wie z. B. Ethylacetat, oder aliphatischen, chlorierten Kohlenwasserstoffen. Die so erhaltene Lösung wird dann auf eine Temperatur von etwa 0°C abgekühlt und dazu wird ein Kondensationsmittel gegeben mit einem Kondensationsmittel/Aminosäure-Molverhältnis gleich oder nahe gleich 1. Das Kondensationsmittel, das typischerweise verwendet wird, ist Dicyclohexyl-carbodiimid (DCI).

## Die Stufe (a)

In der Stufe (a) des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird die Veresterungsreaktion zwischen dem symmetrischen Anhydrid der  $\alpha$ -Amino-geschützten Ala-Aminosäure und dem Verbindungshaken des Harzes in einem inerten, organischen Lösungsmittel in Anwesenheit von Katalysatoren durchgeführt.

Organische Lösungsmittel, die für den vorgesehenen Zweck geeignet sind, werden ausgewählt aus aliphatischen Chlorkohlenwasserstoffen, aliphatischen Ketonen oder Alkylestern.

Spezielle Beispiele für diese Lösungsmittel sind N,N-Dimethylformamid (DMF), Chloroform, Ethylacetat und Tetrahydrofuran.

Die Katalysatoren sind ausgewählt unter solchen, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Insbesondere werden 4-Dimethylaminopyridin und N-Methylmorpholin verwendet.

Die Temperaturen, bei denen die Veresterungsreaktion durchgeführt wird, können im allgemeinen von –10 bis 40°C variieren, und die entsprechenden Zeiten sind die für die Beendigung oder im wesentlichen Beendigung der Reaktion erforderlichen Zeiten.

## Die Stufe (b)

Am Ende der Veresterungsreaktion wird in der Stufe (b) die Schutzgruppe von der  $\alpha$ -Aminogruppe entfernt. Insbesondere wird, wenn die Schutzgruppe Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) ist, eine solche Entfernung durch Behandlung des Peptidharzes mit einem Gemisch (20/80 Vol./Vol.)-Piperidin/DMF während einer Gesamtzeit von etwa 10 min durchgeführt.

## Die Stufen (c) und (e)

Nach Entfernung der  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe und geeignetem Waschen des Peptidharz-Produkts werden in den Stufen (c) und (e) der vorliegenden Erfindung die aufeinanderfolgenden Aminosäuren durch die Acylierungsreaktion zwischen den Aminosäuren, die geeigneterweise geschützt sind und in Übereinstimmung ihrer Carboxygruppe und der Schutzgruppen-entfernten Aminogruppe der an das Harz gebundenen Aminosäure voraktiviert sind, kondensiert.

Insbesondere wird die Acylierungsreaktion in einem inerten, organischen Lösungsmittel in Anwesenheit von Katalysatoren durchgeführt.

Die inerten, organischen Lösungsmittel sind ausgewählt aus aliphatischen, chlorierten Kohlenwasserstoffen, aliphatischen Ketonen oder Alkylestern. Bevorzugt werden N,N-Dimethylformamid (DMF), Chloroform, Ethylacetat, Tetrahydrofuran eingesetzt.

Die Katalysatoren werden unter den aus dem Stand der Technik bekannten ausgewählt. Insbesondere wird für den Asn-Rest 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) verwendet.

Die Temperaturen, bei denen die Acylierungsreaktion durchgeführt wird, liegen im allgemeinen in dem Bereich von –10 bis 40°C.

Die Reaktion wird vorzugsweise bei Raumtemperatur oder nahe Raumtemperatur durchgeführt, und die entsprechenden Zeiten sind diejenigen, die zur Beendigung oder wesentlichen Beendigung der Reaktion not-

wendig sind.

Die Stufe (f)

5 Die Entfernung des Polypeptids (I) von dem unlöslichen, festen Träger kann nach bekannten, allgemeinen Techniken durch saure oder basische Hydrolyse, Aminolyse oder Alkoholyse durchgeführt werden.

Die Reaktion wird typischerweise durchgeführt, indem das Peptid-Harz in einer (90/10, Vol/Vol)-Trifluoresigsäure/Wasser-Lösung bei einer Temperatur im Bereich von 10 bis 30°C suspendiert wird. Am Ende der Reaktion wird das Harz von dem Reaktionsgemisch abfiltriert, wiederholt mit Wasser gewaschen und erneut filtriert.

10 Die vereinigten Filtrate werden durch Eindampfen zur Trockne eingeengt, in Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Die Stufe (g)

15 Das aus der Stufe (f) erhaltene, rohe Polypeptid (I) wird dann durch eine Reihe von Schritten der Gelfiltration, Chromatographie und Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Die dem gewünschten Produkt entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und gefriergetrocknet.

20 Am Ende des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird eine gesamtchromatographische Ausbeute von 59% und eine Ausbeute der gereinigten Fraktion von 73% in bezug auf das aus dem Harz freigesetzte Polypeptid erhalten.

25 Polypeptide der allgemeinen Formel (I) sind mit einer guten immunogenen Aktivität ausgestattet. Die Peptide, worin  $n$  von 3 bis 40 beträgt, sind besonders geeignet für die Zwecke der vorliegenden Erfindung. Es wurde tatsächlich gefunden, daß, wenn diese Polypeptide in einem vollständigen und/oder unvollständigen

25 Freund-Coadjuvans an Stämmen von Mäusen injiziert wurden, welche nicht ansprechbar für (Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>40</sub>-Polypeptid waren, die Bildung von Antipolypeptid-Antikörpern ausgelöst wurde.

30 Infolgedessen können diese Polypeptide für die Herstellung von Antimalaria-Vakzinen, die bei allen Patienten wirksam sind, verwendet werden.

Weiterhin können diese Polypeptide für die Herstellung von diagnostischen Ausrüstungen und in Nachweissystemen für Antisporozoit-Antikörper in Blutproben von malariainfizierten Personen verwendet werden.

35 Die folgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung, ohne sie zu beschränken.

Beispiel 1

35 Synthese von (Asn-Val-Asp-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>3</sub>-(Asn-Ala-Asn-Pro)<sub>3</sub>-Asn-Ala

Die Synthese wurde an einem automatischen Beckman-Synthesizer, Modell 990 B, unter Verwendung eines handelsüblichen Polyacrylamidharzes (Cambridge Research Biochemicals, Pepsyn A), das mit Norleucin als interner Referenz-Aminosäure funktionalisiert war, und p-Hydroxymethylphenoxy-essigsäure als "reversibler Peptid-Harz-Verbindungshaken" durchgeführt.

40 1 g Harz wurde 16 h in 32 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur (20–25°C) unter Rühren gequollen.

Nach Waschen des Harzes mit DMF (10mal, 1 min jeweils) wurde das erste Aminosäure-Radikal (Ala) eingebracht mittels der Veresterungsreaktion an dem reversiblen Haken des symmetrischen Anhydrids von Ala, geschützt an seiner  $\alpha$ -Aminogruppe mit der Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe.

45 2,17 g (1,8 mMol) (Fmoc-Ala)<sub>2</sub>O, 0,200 ml (1,8 mMol) N-Methylmorpholin (NMM) und 0,022 g (0,18 mMol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) wurden in dieser Reihenfolge zugesetzt und in 16 ml DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde während etwa 30 min bei Raumtemperatur gehalten.

50 Am Ende der Veresterungsreaktion wurde das Harz nach dem folgenden Waschzyklus wiederholt gewaschen:

5 Waschungen mit DMF, jeweils 1 min;

1 Waschung mit einer (20/80, Vol/Vol)-Piperidin/DMF-Lösung während 3 min

1 Waschung mit einer (20/80, Vol/Vol)-Piperidin/DMF-Lösung während 7 min;

10 Waschungen mit DMF, jeweils 1 min;

5 Waschungen mit DMF, jeweils 1 min.

Dann wurden die anderen Aminosäuren alle einverleibt, jeweils eine in der Zeit, gemäß der gewünschten Sequenz durch die Acylierungsreaktion zwischen dem Fmoc- $\alpha$ -Amino-geschützten, aktivierten Carboxy-amino-säure-Rest und der wachsenden Polypeptid-Kette.

60 Die Acylierungsreaktion wurde 50 min bei Raumtemperatur durchgeführt unter Verwendung der symmetrischen Anhydride von Fmoc-Aminosäuren Ala, Val, Asp und Pro (1,8 mMol des symmetrischen Anhydrids in 16 ml DMF) und des Pentafluorphenylesters von Fmoc-Asn (1,8 mMol von Fmoc-Asn OPFP [OPFP = Pentafluorphenylester]) in 16 ml DMF in Anwesenheit von 0,244 g (1,8 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT).

65 Das asymmetrische Anhydrid der geschützten Aminosäuren wurde unmittelbar vor der Acylierungsreaktion durch Reaktion von 3,6 mMol Fmoc-Aminosäure mit 0,371 g (1,8 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCI) in 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur während 10 min hergestellt. Am Ende der Reaktion wurde der gebildete Dicyclohexyl-harnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel abgedampft und das so erhaltene, symmetrische Anhydrid gewonnen.

# OS 37 41 183

Für jede Acylierungsreaktion wurde die Vervollständigung der Bildung der amidischen Bindung durch den Ninhydrin-Test (E. Kaiser et al., Anal. Biochem., 1980, 34, 595) und den Trinitrobenzolsulfonsäure-Test (W. S. Hancock et al., Anal. Biochem., 1976, 71, 261) nachgeprüft. Diese Tests ergaben nach 30minütiger Reaktion negative Resultate.

Am Ende der Ansammlung der gewünschten Sequenz wurde die Aminosäure-Analyse des Peptid-Harzes durchgeführt, und die folgenden Ergebnisse wurden erhalten (die theoretischen Werte sind in Klammern angegeben):

Asx	Pro	Ala	Val	NLe	10
18,64 (19)	9,75 (9)	7,00 (7)	3,12 (3)	1,28	

Asx = entweder Asn oder Asp.

Das so synthetisierte Polypeptid wurde dann aus dem Harz durch Reaktion mit 50 ml einer (90/10, Vol/Vol)-Trifluoressigsäure/Wasser-Lösung 3 h bei einer Temperatur von 20°C entfernt.

Das Harz wurde dann von dem Reaktionsgemisch durch Filtrieren unter Vakuum abgetrennt, dann wurde es dreimal mit Wasser, jeweils mit 20 ml, gewaschen und schließlich filtriert.

Die Filtrate wurden vereinigt und durch Eindampfen zur Trockne eingeengt; sie wurden dann in Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Die Ausbeute der Polypeptid-Freisetzung ergab mehr als 98% auf der Basis der Analyse des verbleibenden Harzes.

Das so erhaltene Polypeptid wurde durch Gelfiltrations-Chromatographie über einer Säule von 85 x 2,6 cm Sephadex G-25-Harz, eluiert mit 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH, mit einer Durchflußrate von 38 ml/h gereinigt.

Die Fraktionen entsprechend dem Hauptpeak wurden gesammelt und gefriergetrocknet.

Das Polypeptid wurde weiter durch Ionenaustausch-Chromatographie über Whatmann DE-52-Harz (Säule 25 x 2,6 cm, eluiert mit einem linearen Gradienten von 0,1 bis 0,5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> bei einer Durchflußrate von 36 ml/h) gereinigt.

Die Fraktionen entsprechend dem Hauptpeak wurden gesammelt und gefriergetrocknet.

Die Aminosäure-Analyse des gereinigten Polypeptids ergab folgende Werte:

Asx	Pro	Ala	Val	35
18,66 (19)	9,48 (9)	7,00 (7)	3,02 (3)	

Die gesamtchromatographische Ausbeute auf der Basis der Endgehalte des Harzes und der Freisetzungsausbeute ergab 59%. Die Ausbeute des gereinigten Produkts war 73%.

40

15

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**- L erseite -**